

Optimalisasi PCR-RAPD dan Identifikasi Morfologi Tanaman Kumis Kucing di Provinsi Bengkulu

Optimalization of RAPD-PCR and Morphological Identification of Whisker Plants in Bengkulu Province

Marulak Simarmata^{1*}, Entang Inorih¹, Eka Jan Virgin Haquarsum¹

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu,

Jalan WR. Supratman, Bengkulu 38371. HP 081316095384,

e-mail : marulak_simarmata@yahoo.com

ABSTRACT

A research was conducted with objectives to look for the best DNA extraction methods for whisker plants, to optimize random amplified polymorphism DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) by testing annealing temperatures and screening random primers, and to identify morphology of these plants in Bengkulu Province. DNA's extraction followed the protocols of Geneaid and Epicentre kits were conducted for 11 clones of whisker plants. Optimalization of RAPD-PCR was tested by six levels of annealing temperatures and 16 random primers. Morphological identifications were done in 4 locations in Bengkulu Province, i.e. Bengkulu City, Kuro Tidur (North Bengkulu), Kepahiang, dan Air Dingin (Curup). Results showed that Geneaid demonstrated better results as compared with Epicentre. RAPD-PCR performed optimum at 34.8 °C of annealing temperature; whereas, three random primers showed optimal amplification were I-01, N-01 and P-01, which nucleotide sequences were ACCTGGACAC, CTCACGTTGG, and GTAGCACTCC, respectively. Meanwhile, no morphological variations were found among the samples, except that growths of whisker plants were taller and bigger in Kepahiang and Air Dingin Curup than in others.

Key words: annealing temperatures, cat's-whiskers plants, PCR, random primer

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mencari metode terbaik untuk ekstraksi DNA kumis kucing, optimalisasi reaksi polimerase (PCR-RAPD) dengan pengujian suhu penempelan dan primer acak serta identifikasi morfologi tanaman kumis kucing yang tumbuh di wilayah Provinsi Bengkulu. Ekstraksi DNA mengikuti protokol dari kit Geneaid dan Epicentre dilaksanakan pada 11 klon kumis kucing. Optimalisasi reaksi PCR-RAPD diuji pada enam taraf suhu penempelan dan 16 primer acak. Identifikasi morfologi dilakukan di empat lokasi wilayah Provinsi Bengkulu, yaitu Kota Bengkulu, Kuro Tidur (Bengkulu Utara), Kepahiang, dan Air Dingin (Curup). Dari dua metode ekstraksi DNA yang dicoba tampak bahwa metode Geneaid lebih baik dibandingkan dengan metode Epicentre. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu penempelan yang optimum adalah 34,8 °C dan tiga primer yang menghasilkan amplifikasi optimum adalah primer I-01, N-01, dan P-01 dengan sekuens nukleotida masing-masing adalah ACCTGGACAC, CTCACGTTGG, dan GTAGCACTCC. Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa tidak ada variasi yang jelas pada sampel tanaman yang diamati, kecuali tanaman kumis kucing tumbuh lebih besar dan lebih tinggi di Kepahiang dan Air Dingin Curup.

Kata kunci: kumis kucing, PCR, primer acak, suhu penempelan.

PENDAHULUAN

Tanaman kumis kucing dikenal dengan berbagai nama, seperti dalam bahasa Inggris (*cat's-whiskers*, *kidney tea plant*, *whiskerplant*), Prancis (*the de Java*), Swedia (*morharsmyantha*), adalah spesies [*Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq.]. Spesies ini termasuk dalam family *Lamiaceae/Labiatae* (USDA-ARS, 1998). Beberapa nama daerah Indonesia untuk spesies ini adalah kumis kucing (Sumatra dan Sunda), remujung (Jawa), dan songot koceng (Madura), sedangkan di Malaysia dikenal dengan misai kucing (IPTEKnet, 2005).

Tanaman kumis kucing merupakan tumbuhan terna yang tumbuh tegak, berasal dari wilayah Afrika tropis, menyebar luas di daerah Asia subtropis (China dan Taiwan), Asia tropis (Kamboja, Laos, Thailand, Vietnam, Indonesia, Malaysia, Filipina) dan Australia (USDA-ARS, 1998). Tanaman ini dapat tumbuh dengan baik di tempat yang cukup mendapatkan sinar matahari, ketinggian tempat 500 – 1 200 meter di atas permukaan laut (dpl), curah hujan rata-rata 3 000 mm tahun⁻¹. Sampai saat ini di Indonesia, pulau Jawa masih merupakan sentra penanaman tanaman kumis kucing (IPTEKnet, 2005).

Secara tradisional di Indonesia, daun kumis kucing digunakan untuk minuman teh sehingga disebut *Java tea*. Daun kumis kucing yang kering (*simplisia*) dipakai sebagai obat untuk memperlancar pembuangan air kemih (*diuretic*), sedangkan di India dipakai untuk mengobati rematik (IPTEKnet, 2005). Manfaat farmakologi tanaman kumis kucing telah banyak dilaporkan meliputi *antidiuretic*, *pouricemic*, *renal protective*, *antioxidant*, *antiinflammatory*, *hepatoprotective*, *gastro-protective*, *antihypertensive*, *antidiabetic*, *antihyperlipidemic*, *antimicrobial*, dan *anorexic activities* (IPTEKnet, 2005; Ameer *et al.*, 2012).

Spesies tanaman kumis kucing dapat dibedakan atas warna bunganya yaitu berbunga ungu dan berbunga putih (IPTEKnet, 2005). Keragaman tanaman kumis kucing dapat diteliti tidak hanya secara morfologi, tetapi juga dengan analisis molekuler seperti marka DNA. Hasil penelitian tentang tanaman kumis kucing yang banyak dipublikasi adalah aspek fitokimia dan farmakologinya, tetapi publikasi tentang studi molekulernya sangat terbatas (Ameer *et al.*, 2012).

Langkah awal yang dilakukan untuk meneliti molekuler pada tumbuhan adalah mencari metode ekstraksi DNA yang paling baik (Vural and Dageri, 2009; Sairhar *et al.*, 2013). Keberhasilan ekstraksi DNA tergantung pada metode dan bahan-bahan ekstraksi serta spesies tumbuhan (Padmalatha and Prasad, 2006; Pharmawati, 2009). DNA yang diekstraksi dapat digunakan untuk reaksi polimerase dalam usaha mencari marka molekuler (Staub, 1996; Larashati, 2004; Malviya, 2010). Marka DNA hasil PCR-RAPD banyak dimanfaatkan untuk analisis keragaman genetik seperti pada *Amorphophallus muelleri*, pohon gaharu, dan *Bacillus thuringiensis* (Purba dan Martanti, 2008; Satria *et al.*, 2008; Sijapati *et al.*, 2008). Marka RAPD juga sudah dimanfaatkan untuk menganalisis keterpautan karakter genetik dengan sifat toleransi tanaman, serta konservasi dan autentikasi tumbuhan obat (Khan *et al.*, 2010; Wirnas *et al.*, 2011). Beberapa faktor yang dapat mengoptimalkan reaksi PCR-RAPD adalah jenis dan konsentrasi primer, kuantitas dan kualitas DNA cetakan, dan lingkungan reaksi seperti pH dan suhu penempelan primer (Purba *et al.*, 2008; Sijapati *et al.*, 2008; Vural *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2010).

Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan dua metode ekstraksi DNA pada tanaman kumis kucing, optimalisasi

reaksi RAPD-PCR melalui pengujian enam level suhu penempelan (annealing temperature) dan 16 primer acak (random primer), serta identifikasi morfologi tanaman kumis kucing di wilayah Provinsi Bengkulu.

BAHAN DAN METODE

Studi molekuler tanaman kumis kucing dilakukan di Universiti Malaysia Kelantan, Malaysia pada bulan Juni sampai Juli 2011. Penelitian meliputi pengujian dua metode ekstraksi DNA (Tabel 2) dan optimalisasi reaksi RAPD-PCR dengan menguji ketepatan suhu penempelan primer dan kesesuaian primer acak. Identifikasi morfologi tanaman kumis kucing dilakukan di wilayah Provinsi Bengkulu pada bulan Oktober dan November 2012.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi dan isolasi genomik DNA dilakukan pada 11 klon tanaman kumis kucing (Tabel 1). Dua metode ekstraksi DNA yang diuji adalah Metode Geneaid dan Metode Epicentre.

Tabel 1. Asal usul tanaman kumis kucing yang dianalisis

No	Daerah, Negara
1	Universitas Bengkulu, Indonesia
2	Universitas Bengkulu, Indonesia
3	Perum. Universitas Bengkulu, Indonesia
4	Bengkulu, Indonesia
5	Kuro Tidur Bengkulu, Indonesia
6	Kuala Lumpur, Malaysia
7	Kota Bharu, Malaysia
8	Ulu Kelang, Malaysia
9	Machang, Malaysia
10	Perak, Malaysia
11	Pengkalan Chepa, Malaysia

Metode Geneaid mengikuti protokol dari kit Geneaid yang merupakan modifikasi dari Vogelstein and Gillespie (1979). Daun kumis kucing segar seberat 50 - 100 mg digerus dengan pestel dan mortar dan selanjutnya dimasukkan ke dalam tub-1.5 ml. Sebanyak 400 µl GP1-Buffer dan 5 µm A-RNase dimasukkan ke dalam tub tersebut dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian tub diinkubasi di dalam *waterbath* pada suhu 60 °C selama 10 menit. Ke dalam tub tersebut ditambahkan 100 µl GP2-Buffer (yang sudah dipanaskan sampai 60 °C), divortex, selanjutnya diinkubasi dalam es selama 3 menit. Campuran daun kumis kucing beserta larutannya dipindahkan ke dalam filter column 2-ml dan disentrifus pada kecepatan 1000 rpm selama satu menit. Filter diangkat dan supernatan dipindahkan ke dalam tub-1,5 ml yang baru. GP3-Buffer ditambahkan ke dalam tub tersebut sebanyak 1.5 x volume supernatan dan divortex selama 5 detik. Selanjutnya, 700 µl campuran tersebut dipindahkan ke dalam GD column-2 ml dan dicentrifus pada kecepatan 14 000-16 000 rpm selama 2 menit. Endapan dari *lysis* tersebut dibuang dan GD collumn diletakkan kembali ke dalam tub. Sebanyak 400 µl W1-Buffer dimasukkan ke dalam GD column dan disentrifus pada kecepatan 14 000 - 16 000 rpm selama 30 detik. Endapan dibuang dan GD column dimasukkan kembali ke dalam tub. Proses pencucian diulang dengan 600 µl Wash-Buffer, kemudian 400 µl ethanol. Setelah pencucian ethanol, GD column dikeringkan dengan sentrifus kecepatan 14 000 – 16 000 rpm selama 30 detik. Kemudian GD column yang telah kering dipindahkan ke sebuah tub yang baru. Sebanyak 100 µl Elution-Buffer yang telah dipanaskan dimasukkan ke dalam tub, dibiarkan selama 5 menit dan kemudian disentrifus pada kecepatan 14 000-16 000 rpm selama 30

Tabel 2. Bahan dari dua kit untuk ekstraksi DNA

No	Sumber	
	Geneaid :	Epicentre :
1	400 µL GP1 Buffer	100 µL Quick Extract Plant DNA Extraction Solution
2	5 µL Rnase A	
3	100 µL of GP2 Buffer	
4	Buffer GP3	
5	400 µL W1 Buffer	
6	600 µL Wash Buffer	
7	100 µL Elution Buffer	
8	Filter Column	
9	GD Column	
10	Collection tube	

detik. Endapan yang diperoleh adalah hasil ekstraksi DNA disimpan di lemari pendingin.

Metode Epicentre mengikuti protokol dari kit Epicentre yang merupakan modifikasi dari Steiner *et al.* (1995). Daun tanaman kumis kucing ukuran 3 mm x 5 mm dipotong dan dimasukkan ke dalam tub. Sebanyak 100 µl larutan *Quick Extract Plant DNA Extraction Solution* ditambahkan ke dalam tub dan potongan daun dibenamkan dalam larutan tersebut. Selanjutnya sampel dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 65 °C selama 6 menit dan dilanjutkan dengan pemanasan pada 98 °C selama 2 menit. Potongan daun dikeluarkan dari dalam tube dan larutan yang tertinggal di dalam tub adalah hasil ekstraksi DNA yang dapat digunakan langsung untuk reaksi PCR. Bahan dua kit untuk ekstraksi DNA disajikan pada Tabel 2.

Hasil ekstraksi DNA dari dua metode tersebut difraksinasi secara elektroforesis dalam gel agarosa 1% dengan buffer TBE (Tris-EDTA). Elektroforesis diproses dengan aliran listrik 80 volt selama 60 menit. Kemudian gel hasil elektroforesis direndam selama 10 menit dalam buffer TBE yang sudah ditambah 5 ul ethidium bromida dengan

konsentrasi 1 µg ml⁻¹. Gel hasil rendaman divisualisasi dengan alat UV-transilluminator.

Optimalisasi RAPD-PCR

Dua faktor yang diuji untuk mengoptimalkan produk PCR adalah suhu penempelan primer dan jenis primer. Enam level suhu yang dicoba adalah 53.0; 49.9; 45.3; 39.3; 34.8 dan 31.7 °C. Pengujian suhu tersebut dilakukan dengan dua primer yaitu G-02 dan H-02 (Tabel 3). DNA cetakan yang digunakan adalah hasil ekstraksi DNA yang optimal pada percobaan sebelumnya (sampel nomor 02). Selanjutnya suhu yang paling optimal untuk penempelan primer akan digunakan untuk menyeleksi 15 primer dari First-BASE Laboratories (Tabel 3). DNA cetakan yang digunakan adalah berdasarkan hasil ekstraksi DNA yang optimal (sampel nomor 02).

Volume reaksi yang digunakan untuk masing-masing reaksi adalah 25 µl yang terdiri dari 2.5 µl master Mix (1 x PCR Buffer); 1.5 ul MgCl₂; 0.5 µl dNTP; 0.2 µL Taq Polymerase; 5.0 µl DNA template; 14.3 µl dH₂O dan 1.0 µl primer. Reaksi PCR dilakukan padamesin Thermocycler selama

35 siklus. Tahapan reaksi adalah pemanasan pada suhu 94 °C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan 35 siklus, dimana setiap siklus terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, penempelan primer selama 1 menit (suhu disesuaikan dengan hasil pengujian sebelumnya yaitu 34.8 °C) dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit. Tahapan terakhir adalah satu kali mengulang pemanjangan pada suhu 72°C selama 5 menit sebelum mengakhiri reaksi pada suhu 4°C. Hasil amplifikasi reaksi RAPD-PCR difraksinasi dalam gel agarosa 1% secara elektroforesis dan kemudian divisualisasi (seperti pada percobaan sebelumnya).

Tabel 3. Daftar primer (random primer) yang digunakan ¹⁾

No	Kode	Sekuen nukleotida	GC (%)
1	G-01	CTA CGG AGG A	60
2	G-02	GGC ACT GAG G	70
3	H-01	GGT CGG AGA A	60
4	H-02	TCG GAC GTG A	60
5	I-01	ACC TGG ACA C	60
6	J-01	CCC GGC ATA A	60
7	K-01	CAT TCG AGC C	60
8	K-02	GTC TCC GCA A	60
9	L-01	GGC ATG ACC T	60
10	L-02	TGG GCG TCA A	60
11	M-01	GTT GGT GGC T	60
12	M-02	ACA ACG CCT C	60
13	N-01	CTC ACG TTG G	60
14	O-01	GGC ACG TAA G	60
15	O-02	ACG TAG CGT C	60
16	P-01	GTA GCA CTC C	60

Keterangan: ¹⁾ Sumber: First-BASE Laboratories.

Identifikasi Morfologi

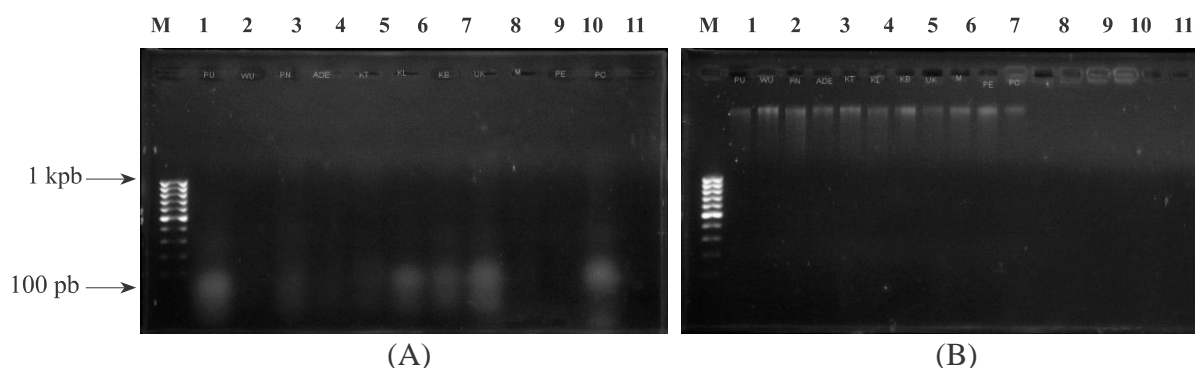
Pengamatan morfologi dilakukan pada bulan Oktober sampai November 2012 di 5 lokasi Provinsi Bengkulu yaitu Kota Bengkulu, Kuro Tidur (Bengkulu Utara),

Kepahiang, dan Air Dingin (Curup). Data kondisi lapangan di lokasi pengamatan dikumpulkan meliputi kelembaban udara, intensitas cahaya matahari, suhu udara dan ketinggian tempat. Kemudian sebanyak 10 tanaman sampel ditetapkan secara sengaja atau *purposive sampling* (Satria *et al.*, 2008; Akter and Zuberi, 2009; Khanlou *et al.*, 2011; Larasati, 2004). Kriteria sampel yang dipilih adalah tanaman yang pertumbuhannya sudah maksimum, memiliki bunga, dan berjarak minimum 500 meter dari sampel sebelumnya. Identifikasi morfologi batang dilakukan di lokasi pengamatan, sedangkan daun dan bunga hanya dikoleksi untuk kemudian diidentifikasi di Laboratorium Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu. Identifikasi morfologi dilakukan sesuai dengan karakterisasi taksonomi, morfologi dan keanekaragaman tumbuhan (Tjitrosoepomo 2003; Larasati, 2004; Satria *et al.*, 2008). Identifikasi daun meliputi bangun daun, ujung daun, pangkal daun, susunan tulang daun, tepi daun, toreh daun, daging daun, permukaan daun, panjang daun dan lebar daun. Identifikasi batang meliputi bangun batang, arah tumbuh, susunan cabang, tinggi tanaman dan diameter pangkal batang. Sementara identifikasi bunga meliputi letak bunga, sifat bunga, warna bunga, warna tangkai sari, panjang tangkai sari dan panjang putik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Genomik DNA

Metode ekstraksi DNA dengan Modifikasi Kit Geneaid memberikan hasil ekstraksi yang lebih optimal dibandingkan Kit Epicentre. Hal ini tampak dari visualisasi DNA hasil elektroforesis yang lebih jelas dengan menggunakan protokol Geneaid dibandingkan dengan Epicentre (Gambar 1).



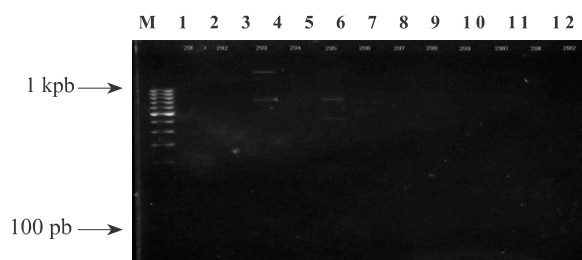
Gambar 1. Visualisasi hasil ekstraksi DNA dengan metode Geneaid (A) dan metode Epicentre (B), [nomor 1 – 11 = klon kumis kucing (Tabel 1); M = tangga DNA 100 pb.

Ekstraksi dan isolasi DNA dipengaruhi oleh kesesuaian buffer dan protokol ekstraksi dengan bahan tanaman (Padmalatha *et al.*, 2006; Pharmawati, 2009; Sairhar *et al.*, 2013). Walaupun komposisi dinding sel dan komponen lain pada daun kumis kucing belum diketahui, tetapi penggunaan protokol dari Geneaid sangat efektif untuk ekstraksi dan isolasi genomik DNA dari dalam sel daun.

Optimalisasi PCR-RAPD

Beberapa faktor yang dapat mengoptimalkan amplifikasi DNA pada reaksi PCR-RAPD adalah suhu penempelan primer dan kesesuaian primer acak, konsentrasi enzim polymerase, dan jumlah siklus amplifikasi (Purba *et al.*, 2008; Sairhar *et al.*, 2013; Vural and Dageri, 2009). Pada Gambar 2, pita DNA tampak pada line 3 (suhu 45.3 °C) dan line 5 (suhu 34,8 °C), keduanya dengan primer G-02. Amplifikasi DNA cetakan dengan PCR-RAPD yang menggunakan sebuah primer acak akan menghasilkan polimorfik DNA yang konstan apabila menggunakan suhu penempelan primer pada level menengah yaitu berkisar 35 – 37 °C (Padmalatha *et al.*, 2006; Vural and Dageri, 2009). Dalam penelitian ini, suhu

34.8 °C adalah suhu penempelan yang optimal untuk hasil PCR-RAPD dari DNA tanaman kumis kucing. Suhu penempelan yang tepat dapat menghasilkan amplifikasi DNA secara optimal yang tampak pada visualisasi pita DNA pada gel elektroforesis. Semakin kecil variasi ukuran pita DNA yang dihasilkan, berarti semakin besar kemungkinan terjadinya polimorfik DNA (William *et al.*, 1990; Staub *et al.*, 1996). Primer acak G-02 pada suhu 34,8 °C memberikan hasil yang optimal karena memberikan polimorfik DNA dengan ukuran yang lebih kecil dibandingkan dengan pada suhu 45.3°C (Gambar 2).

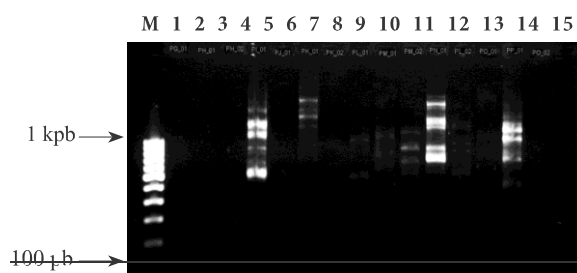


Gambar 2. Visualisasi pengujian 6 level suhu penempelan primer (annealing temperatures = 53.0; 49.9; 45.3; 39.3; 34.8; 31.7°C) dengan primer G-02 (line 1 – 6) dan primer H-02 (line 7 - 12) (M = tangga DNA 100 pb).

Tabel 4. Kondisi di lokasi identifikasi tanaman kumis kucing di Provinsi Bengkulu

Lokasi	Kelembaban (%)	Intensitas Cahaya Matahari (lux)	Suhu Udara (°)	Ketinggian (mdpl)
Bengkulu	72	16.340	32	46
Kepahiang	67	1.252	30	568
Air Dingin	69	1.156	27	712
Kuro Tidur	79	16.690	35	190

Metode PCR-RAPD hingga saat ini dinilai kurang sempurna dan memiliki kelemahan dalam konsistensi produk amplifikasi; tetapi kelemahan ini dapat diatasi dengan mengoptimalkan kondisi PCR, seperti suhu penempelan dan pemilihan primer yang tepat (William *et al.*, 1990; Leal *et al.*, 2010). Ukuran primer acak yang banyak digunakan dalam analisis molekuler tanaman seperti PCR-RAPD adalah terdiri 10 pb dan memiliki kandungan basa G dan C antara 60% - 70% (Staub *et al.*, 1996). Basa G dan C tersebut membentuk ikatan hidrogen rangkap tiga dengan basa komplementernya, sehingga dapat mengikat kuat pada DNA template. Hasil seleksi primer acak pada DNA tanaman kumis kucing tampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi pengujian 15 primer acak (Tabel 3, tanpa primer G-O2) pada suhu 34.8 °C (M = tangga DNA 100 pb).

Ada 8 primer yang menunjukkan polimorfik pita DNA yaitu primer I-01, K-01, L-01, M-01, M-02, N-01, L-02, dan P-02. Hasil amplifikasi primer yang tidak

muncul pada DNA cetakan kemungkinan disebabkan tidak ada sekuen yang cocok antara primer dengan DNA cetakan atau komponen lain yang belum sesuai di dalam reaksi PCR-RAPD (William *et al.*, 1990; Leal *et al.*, 2010; Staub *et al.*, 2010). Di samping itu, kualitas dan kuantitas DNA cetakan juga dapat mempengaruhi reaksi PCR-RAPD. Keberadaan kandungan polifenol dan metabolit sekunder lain, seperti tannin dan terpen, dapat menurunkan kemurnian DNA dan menghambat penempelan primer (Padmalatha *et al.*, 2006; Vural *et al.*, 2009). Berdasar pada kejelasan dan ketebalan pita DNA hasil elektroforesis maka tiga primer yang paling optimal dalam reaksi PCR-RAPD pada genomik DNA tanaman kumis kucing adalah primer I-01, N-01, dan P-01 dengan susunan nukleotida masing-masing adalah ACCTGGACAC, CTCACGTTGG, dan GTAGCACTCC (Gambar 3).

Deskripsi Morfologi

Identifikasi morfologi tanaman kumis kucing dilaksanakan di empat lokasi di Provinsi Bengkulu. Kondisi lingkungan yang diamati di empat lokasi meliputi kelembaban, intensitas cahaya matahari, suhu udara dan ketinggian tempat dirangkum dalam Tabel 4. Bengkulu dan Kuro Tidur adalah dataran rendah yang memiliki kelembaban, suhu udara, dan intensitas cahaya matahari lebih tinggi dibandingkan dengan dataran menengah (Kepahyang) dan dataran tinggi (Air Dingin, Curup).

Tabel 5. Identifikasi morfologi daun tanaman kumis kucing.

Lokasi	Data Kualitatif ¹⁾							Data Kuantitatif ²⁾			
	IB	UD	PD	STD	TD	TRD	DD	PMD	PD (cm)	LD (cm)	KHD
Bengkulu	Jorong	Meruncing	Runcing	Menyirip	Bergerigi kasar	Tumpul dan Dangkal	Tipis seperti selaput	Licin Suram	5.84	3.17	42.30
Kepahyang	Jorong	Runcing	Meruncing	Menyirip	Bergerigi kasar	Tajam dan Dalam	Tipis seperti selaput	Licin Suram	6.86	3.24	48.50
Air Dingin	Jorong	Runcing	Meruncing	Menyirip	Bergerigi kasar	Tajam dan Dalam	Tipis seperti selaput	Licin Suram	7.22	3.57	48.60
Kuro Tidur	Jorong	Meruncing	Runcing	Menyirip	Bergerigi kasar	Tumpul dan Dangkal	Tipis seperti selaput	Licin Suram	5.89	3.21	42.50

Keterangan : ¹⁾IB= Identifikasi Bangun, UD= Ujung Daun, PD= Pangkal Daun, STD= Susunan Tulang Daun, TD= Tepi Daun, TRD= Toreh Daun, DD= Daging Daun, PMD= Permukaan Daun. ²⁾PD= Panjang Daun, LD= Lebar Daun, KHD= Kandungan Hijau Daun

Tabel 6. Identifikasi morfologi batang tanaman kumis kucing.

Lokasi	Data Kualitatif 1)			Data Kuantitatif 2) (cm)	
	IB	AT	SC	DPB	IT
Bengkulu	bersegi 4	Tegak Lurus	Monopodial	0.72	63.70
Kepahyang	bersegi 4	Tegak Lurus	Monopodial	0.93	83.70
Air Dingin	bersegi 4	Tegak Lurus	Monopodial	0.94	85.70
Kuro Tidur	bersegi 4	Tegak Lurus	Monopodial	0.75	70.95

Keterangan: ¹⁾ IB= Identifikasi bangun, AT= Arah Tumbuh, SC= Susunan Cabang ²⁾ DPB= Diameter Pangkal Batang, TT= Tinggi Tanaman

Morfologi daun. Daun kumis kucing yang tumbuh di daerah dataran rendah, menengah dan tinggi memiliki bangun yang hampir sama, kecuali pangkal daun (PD) yang runcing, ujung daun (UD) meruncing, dan toreh daun (TRD) yang tumpul dan dangkal diidentifikasi di dataran rendah Bengkulu dan Kuro Tidur, sedangkan di dataran menengah Kepahyang dan dataran tinggi Air Dingin, PD hanya meruncing tetapi UD runcing, dan TRD tajam dan dalam (Tabel 5).

Variasi pada daun bukanlah karena keragaman genetik tetapi cenderung karena pengaruh perbedaan kondisi lingkungan

(Satria *et al.*, 2008). Secara kuantitatif, ukuran panjang daun (PD) tanaman kumis kucing lebih pendek di Bengkulu dan Kuro Tidur, tetapi tingkat kehijauan daun (KHD) lebih tinggi pada tanaman di dataran menengah Kepahyang dan dataran tinggi Air Dingin. Kisaran panjang dan lebar daun tanaman kumis kucing di Provinsi Bengkulu secara berturut-turut masing-masing adalah 5.84 – 7.22 cm dan 3.17 – 3.57 cm (Tabel 5).

Morfologi Batang. Hasil pengamatan menunjukkan tidak ada variasi pada morfologi batang, semua batang bersegi empat, beralur dengan susunan cabang

Tabel 7. Identifikasi morfologi bunga tanaman kumis kucing.

Lokasi	Data Kualitatif ¹⁾				Data Kuantitatif ²⁾ (cm)	
	ILB	SB	WM	WTS	PTS	PP
Bengkulu	Ujung Batang	Majemuk	Putih	Putih keunguan	5.91	4.10
Kepahiang	Ujung Batang	Majemuk	Putih	Putih keunguan	7.00	6.00
Air Dingin	Ujung Batang	Majemuk	Putih	Putih keunguan	7.20	6.10
Kuro Tidur	Ujung Batang	Majemuk	Putih	Putih keunguan	6.00	5.40

Keterangan: ¹⁾ ILB= Identifikasi Letak Bunga, SB= Sifat Bunga, WM = Warna Mahkota, WTS= Warna Tangkai Sari²⁾ PTS= Panjang Tangkai Sari, PP= Panjang Putik.

yang monopodial. Menurut Tjitrosoepomo (2003), batang beralur adalah batang yang jika dipotong membujur terdapat alur-alur yang jelas; sedangkan disebut monopodial karena batang pokok selalu tampak lebih jelas dengan ukurannya yang lebih besar dan lebih panjang daripada cabangnya. Diameter pangkal batang (DPB) dan tinggi tanaman (TT) kumis kucing masing-masing berkisar 0.72 – 0.94 cm dan 63.7 – 85.7 cm (Tabel 6). DPB dan TT tampak lebih besar dan lebih tinggi pada tanaman kumis kucing dataran menengah Kepahyang dan dataran tinggi Air Dingin.

Morfologi bunga. Tanaman kumis kucing memiliki bunga dengan ukuran tangkai sari yang lebih panjang dari pada putik. Tangkai sari terletak di tengah-tengah putik. Data kualitatif dari empat lokasi yang diamati tidak menunjukkan variasi baik struktur maupun warna. Secara kuantitatif ukuran panjang tangkai sari (PTS) dan panjang putik (PP) secara berturut-turut adalah 5.91 – 7.2 cm dan 4.1 – 6.1 cm (Tabel 7).

KESIMPULAN

Ekstraksi DNA yang optimal pada tanaman kumis kucing adalah dengan metode dan bahan-bahan dari Geneaid. Suhu penempelan primer yang optimal untuk PCR-RAPD pada DNA tanaman kumis kucing

adalah 34.8 °C; sedangkan primer yang paling baik adalah primer I-01, N-01 dan P-01, dengan susunan nukleotida masing-masing adalah ACCTGGACAC, CTCACGTTGG, dan GTAGCACTCC. Walaupun ada sedikit variasi pada daun (pangkal, ujung dan toreh daun), tetapi tidak ada variasi morfologi batang dan bunga tanaman kumis kucing yang tumbuh di dataran rendah, menengah dan dataran tinggi di Provinsi Bengkulu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya diucapkan kepada Dr. Dwi Susanto (Penyelia Pelajar pada Fakultas Agro Industri dan Sumber Asli, Universiti Malaysia Kelantan) yang telah memfasilitasi sebagian dari penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akter, A. and M.I. Zuberi. 2009. Invasive alien species in Northern Bangladesh: identification, inventory, and impacts. *Int. J. of Biodivers. Conserv.* 1(5):129-134.
- Ameer, O.Z., I.M. Salman, M.Z. Asmawi, Z.O. Ibraheem, M.F. Yam. 2012. *Orthosiphon stamineus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *J. Med. Food* 15(8):678-690.

- IPTEKnet. 2005. Teknologi Tepat Guna: Budidaya Pertanian Kumis Kucing (*Orthosiphon spp.*). <http://www.ipitek.net.id/ind/warintek>. [12 Juli 2013].
- Khan, S., K.J. Mirza, and M.Z. Abdin. 2010. Development of RAPD markers for authentication of medicinal plant *Cascuta reflexa*. *EurAsian J. BioSci.* 4:1-7.
- Khanlou, K.M., K. Vandepitte, L.K. Asl, E.V. Bockstaele. 2011. Toward an optimal sampling strategy for assessing genetic variation within and among white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using AFLP. *Genet. and Mol. Biol.* 34(2):252-258.
- Larashati, I. 2004. Keanekaragaman tumbuhan dan populasinya di gunung Kelud, Jawa Timur. *Biodiversitas* 5(2):71-76.
- Leal, A.A., C.A. Mangolin, A.T. do Amaral Junior, L.S.A. Goncalves, C.A. Scapim, A.S. Mott, L.B.O. Eloi, V. Cordoves and M.F.P. du Silva. 2010. Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. *Genet. and Mol. Res.* 9(1):9-18.
- Malviya, N., D. Yadav. 2010. RAPD analysis among pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.] cultivars for their genetic diversity. *GEBJ.* 2010(1):1-9.
- Padmalatha, K., and M.N.V. Prasad. 2006. Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African J. Biotech.* 5(3):230-234.
- Pharmawati, M. 2009. Optimalisasi ekstraksi DNA dan PCR-RAPD pada *Grevillia spp.* *J. Biologi* XIII (1):12-16.
- Purba, Y.S. dan D. Martanti. 2008. Keragaman genetik berdasarkan marka random amplified polymorphic DNA pada *Amorphophallus muelleri* Blume di Jawa. *Biodiversitas* 9(4):245-249.
- Sairhar, P., S. Chouhan, N. Batav, and R. Sharma. 2013. Optimization of DNA isolation process and enhancement of RAPD-PCR for low quality genomic DNA of *Terminalia arjuna*. *J. Genet. Engineering and Biotech.* 11(1):17-24.
- Satria, B., Gustian, E. Swasti, M. Kasim, dan Darnetti. 2008. Karakteristik morfologi dan genetik penghasil gaharu (*Aquilaria spp.*) endemik Sumatera Barat. *Sainstek* XI(1):43-52.
- Sijapati, J., N. Rana, P. Rana, and S. Shrestha. 2008. Optimization of RAPD-PCR conditions for study of genetic diversity in Nepalese isolates of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Nepal J. Sci. Tech.* 9:91-97.
- Staub, J.E., C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and their application in Plant Breeding. *HortScience* 31(5):729-740.
- Steiner, J.J., C.J. Poklemba, R.G. Fjelistrom, and L.F. Elliot. 1995. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis. *Nucleic Acids Res.* 23(13):2569-2570.
- Tjitrosoepomo, G. 2003. Morfologi Tumbuhan. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

- USDA-ARS. 1998. Taxon: *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. <http://www.ars-grin.gov/taxon>. [29 Juli 2013].
- Vogelstein, B. and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(2):615-619.
- Vural, H.G. and A. Dageri. 2009. Optimization of DNA isolation for RAPD-PCR analysis of selected (*Echinaceae purpurea* L. Moench) medicinal plants of conservation concern from Turkey. *J. Med. Plant Res.* 3(1):16-19.
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18:6531-6535.
- Wirnas D., D. Supandie, Trikoesoemaningtyas, dan Sobir. 2011. Analisis marka RAPD yang terpaut dengan toleransi terhadap naungan pada kedelai. *J. Agron. Indonesia* 39(2):73-78.